



(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/36, C07K 14/02, C12N 15/62, C07K 19/00, C12N 15/87		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/46376 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. August 2000 (10.08.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00363 (22) Internationales Anmeldedatum: 4. Februar 2000 (04.02.00)		(81) Bestimmungsstaaten: US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: 199 04 800.2 5. Februar 1999 (05.02.99) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: HILDT, Eberhard [DE/DE]; Robert Koch Institut, Nordufer 20, D-13353 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOFSCHEIDER, Peter [DE/DE]; Nördliche Auffahrtsallee 65, D-80638 München (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	

(54) Title: PARTICLES FOR GENE THERAPY

(54) Bezeichnung: PARTIKEL ZUR GENTHERAPIE

(57) Abstract

The invention relates to particles comprising: a) a protein membrane with a fusion protein which comprises a virus protein, a cell-permeability-mediating peptide and a heterologous cell-specific binding site; and b) a nucleic acid which is contained in the protein membrane and presents sequences for a virus-specific packaging signal and a structural gene. The invention also relates to methods for producing such particles, means suitable for this purpose and the use of the particles in gene therapy.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Partikel, umfassend: (a) eine Proteinhülle mit einem Fusionsprotein, das ein Virus-Protein, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle umfasst, und (b) eine in der Proteinhülle vorliegende Nukleinsäure, die Sequenzen für ein Virus-spezifisches Verpackungssignal und ein Struktur-Gen aufweist. Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung solcher Partikel und hierfür geeignete Mittel sowie die Verwendung der Partikel zur Gentherapie.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Partikel zur Gentherapie

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäure enthaltende Partikel, die gezielt an Zellen binden und in diese ihre Nukleinsäure einführen können. Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung solcher Partikel und hierfür geeignete Mittel sowie die Verwendung der Partikel zur Gentherapie.

10 Für eine Gentherapie ist es wichtig ein Gentransfersystem zu haben, das spezifisch ist, d.h. mit dem gewünschten Zellen erreicht und in diese Gene eingeführt werden können. Bei Leberzellen kann dies prinzipiell mit einem modifizierten Hepatitis B-Virus (HBV) als Vektor möglich, da HBV 15 leberzellspezifisch ist. Für andere Zellen, z.B. Fibroblasten, existiert jedoch kein Gentransfersystem, das befriedigende Ergebnisse liefert.

20 Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Gentransfersystem bereitzustellen, das spezifisch ist, d.h. mit dem gewünschten Zellen erreicht und in diese Gene eingeführt werden können.

25 Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß Nukleinsäure enthaltende Partikel, die ein Fusionsprotein aufweisen, welches ein Virus-Protein, ein 30 Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid, insbesondere ein solches der deutschen Patentanmeldung 198 50 718.6, und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle umfaßt, an entsprechende Zellen binden und in diese ihre Nukleinsäure einführen können. Beispielsweise hat er Nukleinsäure enthaltende HBV-Partikel hergestellt, die an Fibroblasten binden und in diese ihre Nukleinsäure einführen. Hierzu hat er

die Hepatocyten-Bindungsstelle, die in der Region PreS1, insbesondere zwischen den Aminosäuren 21-47, des großen Oberflächenproteins von HBV (LHBs) vorliegt, gegen die $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Bindungsstelle von Fibronectin ausgetauscht, wobei 5 das Zellpermeabilität-vermittelnde Peptid, das in der Region PreS2 von LHBs vorliegt, erhalten blieb. Ferner hat er Partikel mit Fibroblasten-Spezifität hergestellt, indem er das Core-Protein von HBV (HBcAg) mit der $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Bindungsstelle von Fibronectin und dem vorstehenden Zellpermeabilität-vermittelnden Peptid verbunden hat. Des Weiteren hat er 10 erkannt, daß die in den Partikeln enthaltene Nukleinsäure in den Zellen exprimiert wird.

15 Erfnungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, Partikel bereitzustellen, umfassend:

- (a) eine Proteinhülle mit einem Fusionsprotein, das ein Virus-Protein, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid 20 und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle umfaßt, und
- (b) eine in der Proteinhülle vorliegende Nukleinsäure, die Sequenzen für ein Virus-spezifisches Verpackungssignal und ein Struktur-Gen aufweist.

25 Der Ausdruck "Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid" umfaßt jegliche Peptide, die Substanzen, insbesondere Proteinen, eine Zellpermeabilität vermitteln können. Dies sind insbesondere 30 jene Peptide, die in der deutschen Patentanmeldung 198 50 718.6 des Anmelders genannt sind. Besonders bevorzugt ist ein Peptid, das die folgende Aminosäure-(DNA)-Sequenz umfaßt:

P	L	S	S	I	F	S	R	I	G	D	P
CCC	ATA	TCG	TCA	ATC	TTC	TCG	AGG	ATT	GGG	GAC	CCT

Der Ausdruck "zellspezifische Bindungsstelle" umfaßt jegliche Bindungsstellen von Proteinen und sonstigen kleinen Molekülen, über welche die Proteine bzw. die Moleküle an Zellen binden

können. Beispiele solcher Bindungsstellen finden sich in Cytokinen und Wachstumsfaktoren. Ferner finden sie sich in Liganden von Hormon-, Neurotransmitter-, Blutzelloberflächen- und Integrin-Rezeptoren. Eine bevorzugte 5 Bindungsstelle ist die $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Bindungsstelle von Fibronectin. Diese wird nachstehend mit RGD bezeichnet und umfaßt die Aminosäuren Arginin, Glycin und Aspartat.

Der Ausdruck "Virus" umfaßt DNA- und RNA-Viren, insbesondere 10 Adenoviren, Adeno-assozierte Viren, Vaccinia-viren, Baculoviren, Hepatitis C-Viren, Hepatitis A-Viren, Influenzaviren und Hepadna-Viren. Beispiele letzterer sind HBV, WHV ("woodchuck hepatitis virus") GSHV ("ground squirrel hepatitis virus"), RBSHV ("red-bellied squirrel hepatitis 15 virus") DHV ("Pekin duck hepatitis virus") und HHV ("heron hepatitis virus"), wobei HBV bevorzugt ist.

Der Ausdruck "Virus-Protein" betrifft jegliches Protein eines vorstehenden Virus, das als ganzes oder teilweise in einem 20 Fusionsprotein zusammen mit einem Zellpermeabilität-vermittelnden Peptid und einer heterologen zellspezifischen Bindungsstelle in Form eines weiteren Peptids vorliegen kann. Das Protein kann auch bereits das Zellpermeabilität-vermittelnde Peptid enthalten. Ein Beispiel für ein solches Protein ist 25 LHBS. Dieses wird wie andere Oberflächen-Proteine und Core-Proteine, z.B. HBcAg, bevorzugt. Der Ausdruck "heterolog" weist darauf hin, daß das Protein von Natur aus nicht die vorstehende zellspezifische Bindungsstelle aufweist. Günstig kann es sein, wenn die homologe, d.h. von Natur aus 30 vorliegende Bindungsstelle des Proteins ausgeschaltet ist. Besonders günstig kann es sein, wenn die homologe durch die heterologe Bindungsstelle ersetzt ist.

Der Ausdruck "Nukleinsäure" umfaßt RNA und DNA, wobei beide 35 einzelsträngig und/oder doppelsträngig sein können.

Der Ausdruck "Virus-spezifisches Verpackungssignal" weist auf eine Signalsequenz in vorstehender Nukleinsäure hin, mittels

5 dieser die Nukleinsäure in die Proteinhülle eines Partikels verpackt wird. Die Signalsequenz ist spezifisch für ein vorstehendes Virus. Eine bevorzugte Signalsequenz ist jene von HBV. Diese findet sich auf der HBV-DNA und wird in der Literatur mit Epsilon bezeichnet.

10 Der Ausdruck "Struktur-Gen" umfaßt Gene, die für Polypeptide (Proteine) kodieren. Beispiele von Polypeptiden sind Tumornekrosefaktor, Interferone, Interleukine, Lymphokine, Wachstumsfaktoren, Plasmaproteine, z.B. Gerinnungsfaktoren und Stoffwechselenzyme, und Rezeptoren. Insbesondere können die Polypeptide solche sein, welche die Immunogenität von Zellen steigern können. Dies können Polypeptide sein, die Tumorzellen fehlen, z.B. Cytokine, wie IL-2 und GM-CSF, und 15 kostimulatorische Moleküle, wie B7-1, Tumor-assoziierte Antigene, z.B. MAGE1, Tyrosinasen und virale Polypeptide, z.B. E7 von humanem Papillomvirus und EBNA-3-Polypeptid von Epstein-Barr-Virus. Ferner können die Polypeptide Adapter-Polypeptide, Oligomerisierungsmotive eines Polypeptids, 20 Polypeptidfragmente von Virus-Hüllpolypeptiden und Hormone sein. Ferner umfaßt der Ausdruck "Struktur-Gen" Antisense-Oligonukleotide, Peptid-Nukleinsäuren, Consensus-Sequenzen für Transkriptionsfaktoren und Ribozyme.

25 Erfindungsgemäß werden Partikel bevorzugt, die ein Fusionsprotein enthalten, das ein LHBs oder Fragmente davon und eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, umfaßt. Günstig ist es, wenn die heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, anstelle der homologen Bindungsstelle vorliegt. Besonders bevorzugt ist es, wenn das Fusionsprotein 30 die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz aufweist.

35 Des weiteren werden Partikel bevorzugt, die ein Fusionsprotein enthalten, das ein HBcAg, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid, z.B. ein solches der deutschen Patentanmeldung 198 50 718.6, insbesondere mit der vorstehend angegebenen Aminosäu-

resequenz, und eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, umfaßt. Besonders bevorzugt ist es, wenn das Fusionsprotein die Aminosäuresequenz von Fig. 2 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche 5 Aminosäuresequenz aufweist.

Der Ausdruck "eine durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz" weist darauf hin, daß diese Aminosäuresequenz ein Fusionsprotein kennzeichnet, das vergleichbare Elemente und Funktionen wie das Fusionsprotein 10 von Fig. 1 oder Fig. 2 aufweist, sich allerdings bis zu 20 %, vorzugsweise 10 %, von der Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder 2 unterscheidet.

15 Ein erfindungsgemäßes Partikel kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Enthält das Partikel z.B. ein Fusionsprotein, das ein LHBs umfaßt, in dem die homologe durch eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, ersetzt ist, so ist ein Verfahren günstig, das folgende Verfahrensschritte 20 aufweist:

- (a) Co-Transfektion von Zellen, die für ein Hepatitis B-Virus-Genom kodieren, wobei diese kein LHBs exprimieren, mit einem ersten Expressionsvektor, der 25 für ein Fusionsprotein kodiert, das ein LHBs umfaßt, in dem die homologe durch eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, ersetzt ist, und mit einem zweiten Expressionsvektor, der ein Virus-spezifisches Verpackungssignal und ein Struktur-Gen 30 aufweist, und
- (b) Isolierung und Reinigung des Partikels.

Enthält das Partikel ein Fusionsprotein, das ein HBcAG, ein 35 Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid gemäß der deutschen Patentanmeldung 198 50718.6, insbesondere jenes mit vorstehender Aminosäuresequenz, und eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, umfaßt, so ist ein Verfahren

günstig, das folgende Verfahrensschritte umfaßt:

5 (a) Co-Transfektion von Zellen, die für eine HBV-Polymerase kodieren, mit einem ersten Expressionsvektor, der für ein Fusionsprotein kodiert, das ein HBcAg, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid gemäß der deutschen Patentanmeldung 198 50718.6, insbesondere jenes mit vorstehender Aminosäuresequenz, und eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, umfaßt, und mit einem zweiten Expressionsvektor, der ein Virus-spezifisches Verpackungssignal und ein Struktur-Gen aufweist, und

10

15 (b) Isolierung und Reinigung des Partikels.

Hinsichtlich der Ausdrücke "Expressionsvektor", "Zellen", und "Isolierung und Reinigung" wird auf nachstehende Ausführungen, insbesondere in den Beispielen, verwiesen. Die Zellen stellen ebenfalls einen Gegenstand der vorliegenden Erfindung dar. Bezuglich der anderen Ausdrücke wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

25 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Fusionsprotein, das ein LHBs oder Fragmente davon und eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, umfaßt. Vorzugsweise umfaßt das Fusionsprotein die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz.

30 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Fusionsprotein, das ein HBcAg, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, umfaßt. Vorzugsweise umfaßt das Fusionsprotein die Aminosäuresequenz von Fig. 2 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz.

Hinsichtlich des Ausdrucks "eine durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ein vorstehendes Fusionsprotein kodiert. Die Nukleinsäure kann eine RNA oder eine DNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

(a) Die DNA von Fig. 1 oder 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, oder

(b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "eine durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA"

weist darauf hin, daß diese DNA für ein Fusionsprotein kodiert, das vorgleichbare Elemente und Funktionen wie das Fusionsprotein von Fig. 1 oder 2 aufweist, sich allerdings von der Basensequenz von Fig. 1 oder 2 derart unterscheidet, daß in der Aminosäuresequenz ein Unterschied von maximal 20 %, vorzugsweise 10 %, vorliegt.

Eine erfindungsgemäße DNA kann als solche oder in einem Vektor vorliegen. Insbesondere kann eine erfindungsgemäße DNA in einem Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für E. coli sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8, pCEV4, pCDNA3, pKSV10, pRCMV und pRK5 anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um die erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101,

DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21, SG 13009 und M15pRep4, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae*, die tierischen Zellen L, NIH 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero, HeLa, HepG2, CCL13 und 293, die Insektenzellen Sf9 und Sf21 und die Pflanzenzellen *Lupinus albus*.

Der Fachmann kennt Verfahren und Bedingungen Zellen mit einem, die erfindungsgemäße DNA enthaltenden Expressionsvektor zu transformieren bzw. transfizieren und die Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA exprimierte Virus-Protein zu isolieren und zu reinigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit dem Fusionsprotein zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können ebenfalls mit dem Fusionsprotein erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit. Ein solcher umfaßt eine oder mehrere der folgenden Komponenten:

(a) ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein,
(b) eine erfindungsgemäße DNA,
(c) einen erfindungsgemäßen Antikörper, sowie
(d) übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Puffer, Lösungsmittel, Kontrollen, etc.

Von den einzelnen Komponenten können jeweils ein oder mehrere Vertreter vorliegen. Hinsichtlich der einzelnen Ausdrücke wird

auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Die vorliegende Erfindung stellt ein Gentransfer-System bereit, das spezifisch ist, d.h. mit dem gewünschte Zellen erreicht und in diese Gene eingeführt werden können. Die Zellen können einzeln oder in einem Gewebe vorliegen. Ferner können die Zellen isoliert oder im Körper eines Individuums vorliegen. Somit eignet sich die vorliegende Erfindung für eine ex vivo bzw. in vivo Gentherapie von Zellen bzw. Geweben. Die Anwendung der vorliegenden Erfindung kann dabei durch erfindungsgemäße Antikörper überwacht und gesteuert werden.

Somit stellt die vorliegende Erfindung einen großen Schritt dar gentherapeutische Veränderungen an Zellen bzw. Geweben gezielt durchzuführen.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen.

Fig. 1 zeigt die Aminosäure- und DNA-Sequenzen eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins, das ein LHBs und die heterologe Bindungsstelle RGD umfaßt, wobei diese die homologe ersetzt.

Fig. 2 zeigt die Aminosäure- und DNA-Sequenzen eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins, das ein HBcAg, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid der vorstehenden Aminosäuresequenz und die heterologe Bindungsstelle RGD umfaßt.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Herstellung eines erfindungsgemäßen Partikels, das ein Fusionsprotein enthält, welches ein LHBS und eine heterologe Bindungsstelle umfaßt.

5 (A) **Herstellung eines Expressionsvektor, der für sämtliche HBV-spezifischen Proteine mit Ausnahme von LHBS kodiert.**

Hierzu wird von dem Plasmid pTKTHBV2 (vgl. Will et al., Proc. 10 Natl. Acad. Sci. 82 (1985), 891-895) ausgegangen. Dieses enthält zwei Kopien des HBV-Genoms. In einer ersten PCR wird ein Fragment von ntHBV2821 (erste Kopie) bis ntHBV2870 (zweite Kopie) amplifiziert. Der forward Primer (nt 2821-2855) weist folgende Sequenz auf: CCA TAT TCT TGG GAA CAA GAT ATC CAG CAC 15 GGG GC. Eine EcoRV-Schnittstelle ist unterstrichen. Das Triplet ACG zwischen nt 2849-2852 ersetzt das ATG-Startcodon von LHBS. Der backward Primer (nt 2877-2845) weist folgende Sequenz auf: GGA TTG CTG GTG GAA GAT ATC TGC CCC GTG CTG. Eine EcoRV-Schnittstelle ist unterstrichen. Das Triplet CGT zwischen nt 2852-2849 ersetzt das natürliche Triplet CAT. Erhaltene PCR-Fragmente werden mit EcoRV verdaut und über ein 20 präparatives 1%iges Agarosegel gereinigt. Ein Fragment der Größe von ca. 3,3 kb wird aus dem Gel eluiert und aufbewahrt.

25 In einer zweiten PCR werden ein forward Primer, der eine EcoRV-Schnittstelle gefolgt von der nachstehenden Sequenz ntHBV2860 (zweite Kopie)-2878 (erste Kopie) (CAG CAC GGG GCA GAT ATC TTC CAC CAG CAA TCC) aufweist, und ein backward Primer verwendet, der eine EcoRV Schnittstelle gefolgt von der 30 nachstehenden Sequenz ntHBV 2830-2810 (GC CCC GTG CTG GAT ATC ATC TTG TTC CCA AGA ATA TGG) aufweist. Erhaltende PCR-Fragmente werden mit EcoRV verdaut und über ein präparatives 1 % Agarose-Gel gereinigt. Ein Fragment der erwarteten Größe wird aus dem Gel eluiert und dephosphoryliert. Dieses Fragment 35 wird mit dem vorstehenden ca. 3.3 kb großen in eine Ligasereaktion eingesetzt, wodurch der HBV-Expressionsvektor pTKTHBV2Ldef erhalten wird. Dieser Expressionsvektor kodiert für sämtliche HBV-spezifischen Proteine mit Ausnahme von LHBS.

(B) Herstellung eines Expressionsvektors, der für ein Fusionsprotein kodiert, welches ein LHBs und die heterologe Bindungsstelle RGD umfaßt.

5

Ausgehend von dem Plasmid pTKTHBV2 (vgl. vorstehend) wird das Fragment ntHBV2990-834 durch PCR amplifiziert. Der 5'-Primer weist folgende Sequenz auf: AAA AGA TCT GGC CGT GGC GAA GGA GCT GGA GCA TTC. Diese umfaßt eine BgIII-Schnittstelle, gefolgt von einem ATG-Startcodon und der für das Tripeptid RGD-kodierenden Sequenz. Der PreS1-spezifische Leserahmen wird genutzt. Der 3'-Primer wiest die folgende Sequenz auf: AAA AGA TCT GGT TTA AAT GTA TAC CCA AAG. Diese umfaßt eine BgIII-Schnittstelle. Erhaltene PCR-Fragmente werden mit BgIII verdaut und in den mit BgIII-gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pCDNA.3 (Invitrogen) inseriert, wodurch der Expressionsvektor pCRGDLHBs erhalten wird. Dieser Expressionsvektor kodiert für ein N-terminal verkürztes LHBs, das die RGD-Bindungsstelle umfaßt.

20

(C) Herstellung eines ein Struktur-Gen und ein Verpackungssignal aufweisenden Expressionsvektors

Es wird eine für das HBV-Verpackungssignal Epsilon kodierende Sequenz, z.B. ntHBV 1840-1914, mittels PCR amplifiziert. Durch die verwendeten Primer wird eine EcoRV-Schnittstelle eingeführt. Die Sequenz des forward Primers lautet: CCC GAT ATC ATG TCA TCT CTT GTT CAT GTC CTA. Die Sequenz des backward Primers lautet: GGG GAT ATC GGT CGA TGT CCA TGC CCC AAA. Erhaltene PCR-Fragmente werden mit EcoRV gespalten und in den mit EcoRV gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pCDNA.3 (vgl. vorstehend) inseriert, wodurch der Vektor pcVPHBV erhalten wird. Dieser Vektor enthält das HBV-spezifische Verpackungssignal Epsilon.

35

Ausgehend von dem Vektor pCeGFP (Invitrogen), der für ein "green fluorescent protein" unter der Kontrolle des CMV-Promotors kodiert, wird die den CMV-Promotor und das GFP-Gen

enthaltende Sequenz mittels PCR amplifiziert. Der forward Primer hat folgende Sequenz: GGG GGA TCC CGA TGT ACG GGC CAG ATA TAC GCG TTG. Der backward Primer hat folgende Sequenz: GGG GGA TCC GCG GCC GCT TTA CTT GTA. Die verwendeten Primer 5 enthalten jeweils eine BamHI-Schnittstelle. Erhaltene PCR-Fragmente werden mit BamHI gespalten und in den mit BamHI gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pCVPHBV (Invitrogen) inseriert, wodurch der Expressionsvektor pCVPHBVeGFP erhalten wird. Dieser Expressionsvektor enthält das HBV-spezifische 10 Verpackungssignal Epsilon, den CMV-Promotor und eine für eGFP kodierende Sequenz.

(D) Herstellung einer Verpackungszelllinie

15 Etwa 0.8×10^6 HepG2-Zellen werden mit $4\mu\text{g}$ von pTKTHBV2Ldef (vgl. (A)) und $2\mu\text{g}$ pCDNA.3 (vgl. (B)) mittels Lipofektion transfiziert. pCDNA.3 kodiert für G418 Resistenz. 2h nach Transfektion werden die Zellen in ein 700 mg G418/l enthaltendes Medium überführt. G418 resistente Klone werden 20 nach 14d subkultiviert. Die stabile Integration von pTKTHBV2Ldef wird mittels PCR und Southern Blots nachgewiesen. Die Expression des Oberflächenproteins SHBs von HBV und von HBcAg wird mittels spezifischer Antikörper in ELISAS nachgewiesen. Es wird die Verpackungszelllinie HepG2-TKTHBV2Ldef erhalten. Diese Zelllinie exprimiert sämtliche HBV- 25 spezifischen Proteine mit Ausnahme von LHBs.

(E) Herstellung erfindungsgemäßer Partikel

30 Etwa 0.8×10^6 Zellen der Verpackungszelllinie von (D) werden mit $3\mu\text{g}$ von pCRGDLHBs (vgl. (B)) und $3\mu\text{g}$ von pCVPHBVeGFP (vgl. (B)) mittels Lipofektion transfiziert. 72 h nach Transfektion werden die Zellen bzw. deren Überstände gesammelt und einer PEG-Fällung unterworfen. Anschließend wird eine CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Es werden 35 erfindungsgemäße Partikel in reiner Form erhalten. Diese Partikel umfassen sämtliche HBV-spezifischen Proteine mit Ausnahme von LHBs, das durch ein RGD-LHBs ersetzt ist.

Beispiel 2: Herstellung eines erfindungsgemäßen Partikels, das ein Fusionsprotein enthält, welches ein HBcAg, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe Bindungsstelle umfaßt.

Es wird eine für ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid (nachstehend mit ZPP bezeichnet) kodierende DNA verwendet.

10 Diese hat folgende Sequenz: XXX AGA TCT ATG CCC ATA TCG TCA ATC TTC TCG AGG ATT GGG GAC CCT GGA TCC XXX (X bezeichnet ein beliebiges Nukleotid). Diese weist am 5'-Ende eine BgIII-Schnittstelle, gefolgt von einem ATG-Startcodon und an ihrem 3'-Ende eine BamHI-Schnittstelle auf. Ein doppelsträngiges DNA-Molekül, das auf vorstehender Sequenz basiert, wird mit BamHI/BgIII geschnitten und in den mit BamHI-gespaltenen und dephosphorylierten Expressionsvektor pCDNA.3 (vgl. vorstehend) inseriert, wodurch der Expressionsvektor pCZPP erhalten wird.

15

20 Ferner wird der Expressionsvektor pTKTHBV2 (vgl. vorstehend) verwendet, um das Fragment nt-HBV 1861-2136 mittels PCR zu amplifizieren. Der forward-Primer umfaßt die folgende Sequenz: XXX GGA TCC ACT GTT CAA GCC TCC AAG CTG. Diese umfaßt eine BamHI-Schnittstelle gefolgt von der Sequenz ntHB 1861-1881.

25 Der backward Primer umfaßt die folgende Sequenz: XXX GAA TTC TGG ATC TTC CAA ATT AAC ACC CAC CCA. Diese umfaßt eine EcoRI-Schnittstelle gefolgt von der Sequenz ntHBV 2139-2116. In einer zweiten PCR wird das Fragment ntHBV 2140-2480 amplifiziert, das an seinem 5'-Ende mit der für das RGD-Motiv kodierenden Sequenz erweitert ist. Der forward Primer umfaßt die folgende Sequenz: XXX GAA TTC CGA GGC GAC GCG TCT AGA GAC CTA GTA GTC. Diese umfaßt eine EcoRI-Schnittstelle gefolgt von der für das RGD-Motiv kodierenden Sequenz und der Sequenz ntHBV2140-2161. Der backward Primer umfaßt die folgende Sequenz: XXX AAG CTT TCC CCA CCT TAT GAG TCC AAG. Diese umfaßt eine HindIII-Schnittstelle und die Sequenz ntHBV 2480-2460.

30

35

Erhaltene Fragmente beider PCRs werden mit EcoRI gespalten und

miteinander ligiert. Das Ligationsprodukt wird als Template für eine weitere PCR verwendet, wobei als forward Primer jener der ersten PCR und als backward Primer jener der zweiten PCR verwendet werden. Erhaltene PCR-Fragmente werden mit BamHI/-
5 HindIII gespalten und in den mit BamHI/HindIII-gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pCZPP inseriert, wodurch der Expressionsvektor pCZPPHBcRGC erhalten wird. Dieser Expressionsvektor kodiert für HBcAg, das N-terminal die ZPP-Sequenz und im Bereich der Aminosäuren 79-82 die RGD-Sequenz
10 enthält.

Des weiteren werden etwa 0.8×10^6 HepG2-Zellen mittels Lipofektion mit $4\mu\text{g}$ eines für HBV-Polymerase kodierenden Expressionsvektors und mit $2 \mu\text{g}$ pCDN3 transfiziert. Es wird auf die vorstehende Beschreibung von Beispiel 1, (D) verwiesen.
15 Es wird eine mit HepG2-HBV Pol bezeichnete Zelllinie erhalten.

Etwa 0.8×10^6 Zellen der Zelllinie HepG2-HBV Pol werden mit $3\mu\text{g}$ von pCZPPHBc RGC und $3\mu\text{g}$ von pCVPHBVeGFP (vgl. Beispiel 1, B)
20 mittels Lipofektion transfiziert. Es wird auf vorstehende Beschreibung von Beispiel 1, (E) verwiesen. Es werden erfindungsgemäße Partikel in reiner Form erhalten.

**Beispiel 3: Nachweis der Expression einer in
25 erfindungsgemäßen Partikeln vorliegender
Nukleinsäure in Fibroblasten**

Etwa 1×10^9 erfindungsgemäße Partikel von Beispiel 1 (E) bzw.
Beispiel 2, werden in $100\mu\text{l}$ 0,9 % Saline gelöst und in die
30 Schwanzvene von balb/c Mäusen injiziert. 48 h nach Injektion wird der Soleus- und der Tibialis anterior Muskel isoliert und in einem "tissue tag" langsam eingefroren. Aus den eingefrorenen Präparaten werden Kryoschnitte angefertigt und diese unter einem Fluoreszenzmikroskop bei Blauanregung analysiert.

35

Es wird eine grüne Fluoreszenz in den Fibroblasten erhalten, was die Expression des "green fluorescent protein" zeigt.

Beispiel 4: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins

5 Es wird das erfindungsgemäße Fusionsprotein von Fig. 1 hergestellt. Hierzu wird die DNA von Fig. 1 am 5'-Ende mit einem BglII-Linker und am 3'-Ende mit einem BglII-Linker versehen und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen nachgespalten. Das erhaltene BglII/BglII-Fragment wird in den Bam-
10 HI-gespaltenen Expressionsvektor pQE8 inseriert, so daß das Expressionsplasmid pQE8/LHBS erhalten wird. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfindungsgemäßen Fusionsprotein von Fig. 1 (C-Terminuspartner). pQE-8/LHBS wird zur Transformation
15 von E.coli SG 13009 (vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien werden in einem LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin und 25 μ g/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60 μ M Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid
20 wird eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wird mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Qia-
gen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wird in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach
25 seiner Neutralisierung wird das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).
30 Es zeigt sich, daß ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

Beispiel 5: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers

35 Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 4 wird einer 18 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wird eine 38 kD Bande

aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke werden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgt, bestimmt wird. Mit dem Gel-gereinigten Fusionspolypeptid werden Tiere wie folgt immunisiert:

10 **Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen**

Pro Immunisierung werden 35 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

15 Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)
20 Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfundungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 4 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wird das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgen mehrere Waschschritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat,

400 μ M Nitroblau-tetrazolium, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden.

5 Es zeigt sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

10 Pro Immunisierung werden 40 μ g Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
15 Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans;
icFA)
Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

20 Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

Pro Immunisierung werden 12 μ g Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung ist das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

5 Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

10 Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans;
icFA)

Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)

Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)

Tag 87: Fusion

15 Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet.
Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper werden nachgewiesen.

Patentansprüche

1. Partikel, umfassend:
 - 5 (a) eine Proteinhülle mit einem Fusionsprotein, das ein Virus-Protein, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle umfaßt, und
 - (b) eine in der Proteinhülle vorliegende Nukleinsäure, die Sequenzen für ein Virus-spezifisches Verpackungssignal und ein Struktur-Gen aufweist.
- 10 2. Partikel nach Anspruch 1, wobei das Virus-Protein von einem Adenovirus, Adeno-assoziierten Virus, Vacciniavirus, Baculovirus oder Hepadna-Virus stammt.
- 15 3. Partikel nach Anspruch 2, wobei das Hepadna-Virus ein Hepatitis B-Virus ist.
- 20 4. Partikel nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das Virus-Protein ein Oberflächenprotein ist.
5. Partikel nach Anspruch 4, wobei das Oberflächenprotein ein LHBs ist.
- 25 6. Partikel nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das Virus-Protein ein Core-Protein ist.
7. Partikel nach Anspruch 6, wobei das Core-Protein ein HBcAg ist.
- 30 8. Partikel nach einem der Ansprüche 1-7, wobei das Zellpermeabilität-vermittelnde Peptid die folgende Aminosäuresequenz aufweist:
- 35 9. Partikel nach einem der Ansprüche 1-8, wobei die heterologe zellspezifische Bindungsstelle RGD ist.

10. Partikel nach einem der Ansprüche 1-9, wobei das Fusionsprotein jenes von Fig. 1 oder 2 ist.

11. Verfahren zur Herstellung des Partikels nach Anspruch 1,
5 wobei das Fusionsprotein ein LHBs und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle enthält, umfassend die folgenden Verfahrensschritte:

10 (a) Co-Transfektion von Zellen, die für ein Hepatitis B-Virus-Genom kodieren, wobei diese kein LHBs exprimieren, mit einem ersten Expressionsvektor, der für ein Fusionsprotein kodiert, das ein LHBs und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle umfaßt, und mit einem zweiten Expressionsvektor, der ein Virus-spezifisches
15 Verpackungssignal und ein Struktur-Gen aufweist, und

(b) Isolierung und Reinigung des Partikels.

20 12. Verfahren zur Herstellung des Partikels nach Anspruch 1, wobei das Fusionsprotein ein HBcAg, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle aufweist, umfassend die folgenden Verfahrensschritte:

25 (a) Co-Transfektion von Zellen, die für eine HBV-Polymerase kodieren, mit einem ersten Expressionsvektor, der für ein Fusionsprotein kodiert, das ein HBcAg, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle umfaßt, und mit einem zweiten Expressionsvektor, der ein Virus-spezifisches Verpackungssignal und ein Struktur-Gen aufweist, und

30 (b) Isolierung und Reinigung des Partikels.

35 13. Fusionsprotein, umfassend ein Virus-Protein, ein

zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle.

14. Fusionsprotein nach Anspruch 13, umfassend die

5 Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz.

10 15. DNA, kodierend für das Fusionsprotein nach Anspruch 13.

16. DNA, kodierend für das Fusionsprotein nach Anspruch 14, umfassend:

15 (a) Die DNA von Fig. 1 oder 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, oder

(b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten gentischen Code verwandte DNA.

20 25 17. Expressionsvektor, kodierend für die DNA nach Anspruch 16.

18. Verwendung des Partikels nach einem der Ansprüche 1-10 zur Gentherapie von Zellen und Geweben.

1/2

atggggccgtggcgaaggagctggagcattcgggctgggttccccacccgcacggaggcctttggggtagccctcaggctcaggcataactacaaacttgcacccgcctccacc
aatcgccagacaggaaggcagcctaccccgctgtctccaccccttgagaaacactcatcctcaggcc
atgcagtggattccacaaccccttacccaaactctgcaagatcccagagtgagaggcctgtatttc
cctgctggctccaggcactaaaccctgttccgactactgcctctcccttatcgta
atcttcgaggattggggaccctgcgtgaacatggagaacatcacatcaggattcttaggaccc
cttctcggttacaggcggggttttcttgcataagaatcctcacaataccgcagagtctagac
tcgtggacttcctcaattttctaggggaactaccgtgtcttggccaaatcgctcc
ccaacctccaatcactaccaacccctgtcctccaaacttgcctgttgcctggatgtctg
cggcgtttatcatcttccttcatcctgctgatgcctcatcttgcgttgcgttgc
tatcaaggatgttgcctgttgccttaattccaggatcctcaaccaccacgcacgggaccatgc
cgaacctgcatgactactgctcaaggaacctctatgtatccctcctgttgcgttgc
gacggaaattgcacctgtattccatccatcatcctggcttcggaaaattcctatggagtg
gcctcagccgttctcctggctcagttacttagtgccttgcgttgcgttgc
cccactgttggcttcagttatatggatgtgttgcgttggccaaatctgtacagcatctg
agtcccttttaccgctgttaccaatttcttgcgttgcgttgcgttgc
atccat

MGRGDAGAFGLGFTPPHGLLGWSPQAQGILETLPANPPPASTNRQSGRQPTPLSPPLRNTHPQA
MQWNSTTFHQTLQDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNPVPTVSPSISSIFSRIGDPA
LNMEINITSGFLGP
LLVLQAGFLLTRILTIQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSP
TSNHSPTSCPPTCPGYRW
MCL
RRFIIFLFILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGS
STTSTGPCRTCTTPA
QGTSMYPS
CCCTKPS
DGNCTCIP
IPIPSSWAFGKFLWE
ASARFSWLSLLV
P
FVQWFVGLSPTV
WLSVI
WMMWY
WGPSL
YSIL
SPFLPLLP
IFFCLW
VYI

FIG.1

2/2

atgcccataatcgtaatcttcgaggattggggaccctggatccactactgttcaagcctccaag
ctgtgcctgggtggcttggggcatggacatcgacccttataaagaattggagctactgtggag
ttactctcgaaaaatcgatcttgccttgcacttgccttgcacttgccttgcacttgccttgcact
ctgtatcgaaagccttagagtctcctgagcattgttacccatcaccatactgcactcaggcaagca
attcttgctgggggaactaatgactctagctacacccatgggtgggttaatttggaaagatccagaa
ttccgaggcgacgcgtctagagaccttagttagtcagttatgtcaacactaatatggcctaaagttc
aggaactcttgcgtttcacatttgcacttgcacttgcacttgcacttgcacttgcacttgcact
gtgtcttcggagtgtggattcgactcctccagctatagaccaccaaatgcccctatcctatca
acacttccggaaaactactgtttagacgacgaggcaggccctagaagaactccctcgcc
cgcagacgaaggctcaatcgccgcgtcgcagaagatctcaatctcgaaacctcaatgttagat
tcc

MPLSSIFSRIGDPTVQASKLCLGWLWGMIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLDTASALYR
EALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMTLATWGVNLEDPEFRGDASRDLVSYVNTNMGLKFRQL
LWFHISCLTFGRETVIEYLVSGVWIRTPPAYRPPNAPISTLPETTVRRGRSPRRTPSPRR
RSQSPRRRSQSREPQC

Fig. 2

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Dr. Eberhardt Hildt, Klinikum Rechts d. Isar
- (B) STRASSE: Ismaninger Str.
- (C) ORT: Muenchen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 81675

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Partikel zur Gentherapie

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 19

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: DE 199 04 800.2

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 347 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Met	Gly	Arg	Gly	Asp	Gly	Ala	Gly	Ala	Phe	Gly	Leu	Gly	Phe	Thr	Pro	
1					5						10			15		

Pro	His	Gly	Gly	Leu	Leu	Gly	Trp	Ser	Pro	Gln	Ala	Gln	Gly	Ile	Leu	
				20				25						30		

Glu	Thr	Leu	Pro	Ala	Asn	Pro	Pro	Pro	Ala	Ser	Thr	Asn	Arg	Gln	Ser	
			35					40					45			

Gly	Arg	Gln	Pro	Thr	Pro	Leu	Ser	Pro	Pro	Leu	Arg	Asn	Thr	His	Pro	
			50			55					60					

Gln	Ala	Met	Gln	Trp	Asn	Ser	Thr	Thr	Phe	His	Gln	Thr	Leu	Gln	Asp	
					65			70			75			80		

Pro	Arg	Val	Arg	Gly	Leu	Tyr	Phe	Pro	Ala	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	
					85				90					95		

Thr	Val	Asn	Pro	Val	Pro	Thr	Thr	Val	Ser	Pro	Ile	Ser	Ser	Ile	Phe	
					100				105					110		

Ser	Arg	Ile	Gly	Asp	Pro	Ala	Leu	Asn	Met	Glu	Asn	Ile	Thr	Ser	Gly	
						115			120				125			

Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr
 130 135 140
 Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu
 145 150 155 160
 Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser
 165 170 175
 Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly
 180 185 190
 Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu
 195 200 205
 Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met
 210 215 220
 Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly
 225 230 235 240
 Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro
 245 250 255
 Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro
 260 265 270
 Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser
 275 280 285
 Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe
 290 295 300
 Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp
 305 310 315 320
 Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu
 325 330 335
 Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
 340 345

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 215 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Pro Leu Ser Ser Ile Phe Ser Arg Ile Gly Asp Pro Thr Val Gln
 1 5 10 15
 Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile Asp Pro
 20 25 30
 Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu Pro Ser
 35 40 45

Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser Ala Leu
 50 55 60

Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His His Thr
 65 70 75 80

Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr Leu Ala
 85 90 95

Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Glu Phe Arg Gly Asp Ala
 100 105 110

Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys
 115 120 125

Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
 130 135 140

Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
 145 150 155 160

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
 165 170 175

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr
 180 185 190

Pro Ser Pro Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser
 195 200 205

Gln Ser Arg Glu Pro Gln Cys
 210 215

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 663 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

ATGCCCATAT CGTCAATCTT CTCGAGGATT GGGGACCCCTG GATCCACTAC TGTCAAGCC	60
TCCAAGCTGT GCCTTGGGTG GCTTTGGGGC ATGGACATCG ACCCTTATAA AGAATTTGGA	120
GCTACTGTGG AGTTACTCTC GTTTTGCCCT TCTGACTTCTT TTCCCTCAGT ACGAGATCTT	180
CTAGATACCG CCTCAGCTCT GTATCGGGAA GCCTTAGAGT CTCCTGAGCA TTGTTCACCT	240
CACCATACTG CACTCAGGCA AGCAATTCTT TGCTGGGGGG AACTAATGAC TCTAGCTACC	300
TGGGTGGGTG TTAATTGGGA AGATCCAGAA TTCCGAGGCG ACGCGTCTAG AGACCTAGTA	360
GTCAGTTATG TCAACACTAA TATGGGCCTA AAGTTCAGGC AACTCTGTG GTTTCACATT	420
TCTTGTCTCA CTTTTGGAAG AGAAACCGTT ATAGAGTATT TGGTGTCTTT CGGAGTGTGG	480

ATTCGCACTC CTCCAGCTTA TAGACCACCA AATGCCCTA TCCTATCAAC ACTTCCGAA	540
ACTACTGTTG TTAGACGACG AGGCAGGTCC CCTAGAAGAA GAACTCCCTC GCCTCGCAGA	600
CGAAGGTCTC AATGCCCGCG TCGCAGAAGA TCTCAATCTC GGGAACCTCA ATGTTAGTAT	660
TCC	663

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1047 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

ATGGGCCGTG GCGAAGGAGC TGGAGCATTG GGGCTGGTT TCACCCACC GCACGGAGC	60
CTTTTGGGT GGAGCCCTCA GGCTCAGGGC ATACTACAAA CTTGCCAGC AAATCCGCCT	120
CCTGCCCTCA CCAATGCCA GACAGGAAGG CAGCCTACCC CGCTGTCTCC ACCTTGAGA	180
AACACTCATC CTCAGGCCAT GCAGTGGAAAT TCCACAACCT TTCACCAAAC TCTGCAAGAT	240
CCCAGAGTGA GAGGCCTGTA TTTCCCTGCT GGTGGCTCCA GTTCAGGAGC AGTAAACCC	300
GTTCCGACTA CTGCCTCTCC CTTATCGTCA ATCTTCTCGA GGATTGGGA CCCTGCGCTG	360
AACATGGAGA ACATCACATC AGGATTCCCTA GGACCCCTTC TCGTGTACA GGCGGGTTT	420
TTCTTGTGA CAAGAACCT CACAATACCG CAGAGTCTAG ACTCGTGGTG GACTTCTCTC	480
AATTTCTAG GGGAAACTAC CGTGTGTCTT GGCCAAAATT CGCAGTCCCC AACCTCCAAT	540
CACTCACCAA CCTCCTGTCC TCCAACTTGT CCTGGTTATC GCTGGATGTG TCTGCGCGT	600
TTTATCATCT TCCTCTTCAT CCTGCTGCTA TGCCTCATCT TCTTGTGGT TCTTCTGGAC	660
TATCAAGGTA TGTTGCCCGT TTGTCCTCTA ATTCCAGGAT CCTCAACCAC CAGCACGGGA	720
CCATGCCGAA CCTGCATGAC TACTGCTCAA GGAACCTCTA TGTATCCCTC CTGTTGCTGT	780
ACCAAACCTT CGGACGGAAA TTGCACCTGT ATTCCCATCC CATCATCCTG GGCTTCCGGA	840
AAATTCCAT GGGAGTGGGC CTCAGCCCGT TTCTCCTGGC TCAGTTTACT AGTGCCATTT	900
GTTCAGTGGT TCGTAGGGCT TTCCCCACT GTTGGCTTT CAGTTATATG GATGATGTGG	960
TATTGGGGC CAAGTCTGTA CAGCATTTG AGTCCCTTT TACCGCTGTT ACCAATTTC	1020
TTTTGTCTTT GGGTATAACAT TTAAACC	1047

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 35 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CCATATTCTT GGGAAACAAGA TATCCAGCAC GGGGC

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 33 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GGATTGCTGG TGGAAGATAT CTGCCCGTG CTG

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 33 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CAGCACGGGG CAGATATCTT CCACCAGCAA TCC

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 38 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

GCCCCGTGCT GGATATCATC TTGTTCCCAA GAATATGG

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

AAAAGATCTG GCCGTGGCGA AGGAGCTGGA GCATTC

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

AAAAGATCTG GTTTAAATGT ATACCCAAAG

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

CCCGATATCA TGTCATCTCT TGTTCATGTC CTA

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

GGGGATATCG GTCGATGTCC ATGCCCAAA

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

GGGGGATCCC GATGTACGGG CCAGATATAC GCGTTG

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

GGGGGATCCG CGGCCGCTTT ACTTGTA

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

NNNAGATCTA TGCCCATATC GTCAATCTTC TCGAGGATTG GGGACCCTGG ATCCNNN

57

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

NNNGGATCCA CTGTTCAAGC CTCCAAGCTG

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

NNNGAATTCT GGATCTTCCA AATTAACACC CACCA

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

NNNGAATTCC GAGGCGACGC GTCTAGAGAC CTAGTAGTC

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

NNNAAGCTTT CCCCCACCTTA TGAGTCCAAG

PARTICLES FOR GENE THERAPY

5 The present invention relates to nucleic acid containing particles which specifically bind to cells and can introduce their nucleic acid into these cells. The invention further relates to methods of preparing such particles and means suitable for this purpose as well as the use of the particles in gene therapy.

10 For gene therapy it is important to have a gene transfer system which is specific, in other words with which desired cells can be reached and genes can be introduced into these cells. In the case of liver cells, this is generally possible with a modified hepatitis B virus (HBV) as a vector, since HBV is specific for liver cells. For other cells, for example fibroblasts, there however exists no gene transfer system which yields satisfactory results.

15

It is therefore the object of the invention to provide a gene transfer system which is specific, in other words with which desired cells can be reached and genes can be introduced into these cells.

According to the invention, this is achieved by the subject matter in the claims.

20

The present invention is based on the applicant's recognition that nucleic acid-containing particles comprising a fusion protein which includes a virus protein, a cell permeability-mediating peptide, in particular such a peptide as described in the German patent application 198 50 718.6 and a heterologous cell-specific binding site, can bind to corresponding cells and can introduce their nucleic acid into these cells. The applicant has for example made nucleic acid containing HBV particles which bind to fibroblasts and introduce their nucleic acid into these fibroblasts. To this end he exchanged the hepatocyte binding site which is present in the region PreS1, in particular between amino acids 21-47, of the large surface protein of HBV (LHBs) with the $\alpha 5\beta 1$ -integrin binding site of fibronectin, wherein the cell permeability-mediating peptide present in the region PreS2 of LHBs remained intact. Furthermore, he made particles with specificity for fibroblasts by joining the core protein of HBV (HBcAg) with the $\alpha 5\beta 1$ -integrin binding site of fibronectin and the cell permeability-mediating peptide mentioned above. Moreover, he recognized that the nucleic acid contained in the particles is expressed in the cells.

According to the invention the applicant's findings are used to provide particles including:

5 (a) a protein envelope with a fusion protein comprising a virus protein, a cell permeability-mediating peptide and a heterologous cell-specific binding site, and

(b) a nucleic acid present in the protein envelope which comprises sequences for a virus-specific packaging signal and a structural gene.

10 The term "cell permeability-mediating peptide" includes any peptides capable of mediating a cell permeability for substances, in particular proteins. These are in particular the peptides indicated in the applicant's German patent application 198 50 718.6. Especially preferred is a peptide including the following amino acid-(DNA)-sequence:

15 P L S S I F S R I G D P
CCC ATA TCG TCA ATC TTC TCG AGG ATT GGG GAC CCT

20 The term "cell-specific binding site" includes any binding sites of proteins and other small molecules via which the respective proteins or molecules can bind to cells. Examples of such binding sites are to be found in cytokines and growth factors. They are further to be found in ligands of hormone receptors, neurotransmitter receptors, blood cell surface receptors and integrin receptors. A preferred binding site is the $\alpha 5\beta 1$ -integrin binding site of fibronectin. In the following, this binding site is referred to as RGD and includes the amino acids arginine, glycine and aspartate.

25 The term "virus" includes DNA and RNA viruses, in particular adenoviruses, adeno-associated viruses, vaccinia viruses, baculoviruses, hepatitis C viruses, hepatitis A viruses, influenza viruses and hepadnaviruses. Examples of the latter are HBV, WHV ("woodchuck hepatitis virus"), GSHV ("ground squirrel hepatitis virus"), RBSHV ("red-bellied squirrel hepatitis virus") DHV ("Pekin duck hepatitis virus") and HHV ("heron hepatitis virus"), wherein HBV is preferred.

30 The term „virus protein“ relates to any protein of a virus mentioned above which can be present in its entirety or partially in a fusion protein together with a cell permeability-mediating peptide and a heterologous cell-specific binding site in the form of a further peptide. The protein can also already contain the cell permeability-mediating peptide. An example of one such protein is LHBs. This protein is preferred, as are other surface proteins and core proteins, for example HBcAg. The term

“heterologous” indicates that the protein does not intrinsically comprise the cell permeability-mediating peptide mentioned above. It can be advantageous when the homologous, i.e. intrinsically present binding site of the protein is switched off. It can be especially advantageous if the homologous binding site is replaced with the heterologous binding site.

5

The term “nucleic acid” includes RNA and DNA, wherein both can be single stranded and/or double stranded.

10 The term “virus specific packaging signal” indicates a signal sequence in the above nucleic acids, by means of which the nucleic acids are packaged into the protein envelope of a particle. The signal sequence is specific for an above-mentioned virus. A preferred signal sequence is that of HBV. This is to be found in the HBV DNA and is referred to in the literature as epsilon.

15 The term “structural gene” includes genes which code for polypeptides (proteins). Examples of such polypeptides are tumor necrosis factors, interferons, interleukins, lymphokines, growth factors, plasma proteins, for example clotting factors and metabolic enzymes, and receptors. In particular, the polypeptides can be those which are capable of enhancing the immunogenicity of cells. These can be polypeptides lacking in tumor cells, for example cytokines such as IL-2 and GM-CSF, and co-stimulating molecules such as B7-1, tumor-associated antigens, for example MAGE1, 20 tyrosinases and viral polypeptides, for example E7 from the human papilloma virus and EBNA-3 polypeptide from the Epstein-Barr virus. Furthermore, the polypeptides can be adapter polypeptides, oligomerization motifs of a polypeptide, polypeptide fragments of virus envelope polypeptides and hormones. The term “structural gene” further includes antisense oligonucleotides, peptide nucleic acids, consensus sequences for transcription factors and ribozymes.

25

According to the invention particles containing a fusion protein are preferred, wherein the fusion protein includes an LHBs or fragments thereof and a heterologous binding site, in particular RGD. It is advantageous if the heterologous binding site, for example RGD, is present in place of the homologous binding site. It is especially preferred if the fusion protein comprises the amino acid 30 sequence of Fig.1 or an amino acid sequence differing therefrom in one or more amino acids.

Furthermore, particles are preferred which contain a fusion protein which includes an HBcAG, a cell permeability-mediating peptide, for example as indicated in the German patent application 198 50 718.6, in particular with the amino acid sequence given above, and a heterologous binding site,

in particular RGD. It is especially preferred if the fusion protein comprises the amino acid sequence of Fig. 2 or an amino acid sequence differing therefrom in one or more amino acids.

5 The term "an amino acid sequence differing in one or more amino acids" indicates that this amino acid sequence specifies a fusion protein which has comparable elements and functions as the fusion protein in Fig. 1 or figure 2 but which differs from the amino acid sequence of Fig. 1 or Fig. 2 up to 20%, preferably 10%.

10 A particle according to the invention can be prepared by conventional methods. If the particle contains for example a fusion protein including an LBHs in which the homologous binding site is replaced by a heterologous binding site, in particular RGD, a method containing the following method steps is advantageous:

15 (a) cotransfection of cells coding for a hepatitis B virus genome, wherein the cells do not express LBHs, with a first expression vector coding for a fusion protein including an LBHs, in which the homologous binding site is replaced by a heterologous binding site, in particular RGD, and with a second expression vector comprising a virus-specific packaging signal and a structural gene, and

(b) isolation and purification of the particle.

20

If the particle contains a fusion protein including an HBcAg, a cell permeability-mediating peptide according to the German patent application 198 50 718.6, in particular the peptide with the above amino acid sequence, and a heterologous binding site, in particular RGD, then a method including the following method steps is advantageous:

25

30 (a) cotransfection of cells coding for an HBV polymerase with a first expression vector coding for a fusion protein including HBcAg, a cell permeability-mediating peptide according to the German patent application 198 50 718.6, in particular the peptide with the above amino acid sequence, and a heterologous binding site, in particular RGD, and with a second expression vector comprising a virus-specific packaging signal and a structural gene, and

(b) isolation and purification of the particle.

With respect to the terms "expression vector", "cells" and "isolation and purification", reference is made to the explanations below, in particular in the examples. The cells also represent subject matter of the present invention. With respect to the other terms, reference is made to the above explanations.

5

Further subject matter of the present invention is a fusion protein including an LHBs or fragments thereof and a heterologous binding site, in particular RGD. Preferably the fusion protein includes the amino acid sequence of Fig. 1 or an amino acid sequence differing therefrom in one or more amino acids.

10

Further subject matter is a fusion protein including an HBcAg, a cell permeability-mediating peptide and heterologous binding site, in particular RGD. The fusion protein preferably includes the amino acid sequence of Fig. 2 or an amino acid sequence differing therefrom in one or more amino acids.

15

With respect to the term "an amino acid sequence differing in one or more amino acids", reference is made to the above explanations.

20

Further subject matter of the present invention is a nucleic acid coding for a fusion protein mentioned above. The nucleic acid can be an RNA or a DNA. Preferably it is a DNA which includes the following:

- (a) The DNA of Fig. 1 or 2 or a DNA differing therefrom by one or more base pairs, or
- (b) a DNA related to the DNA of (a) by virtue of the degenerate genetic code.

25

The term "a DNA differing by one or more base pairs" indicates that this DNA codes for a fusion protein which comprises comparable elements and functions as the fusion protein of Fig. 1 or 2, but which differs from the base sequence of Fig. 1 or 2 such that, in the amino acid sequence, a difference of maximum 20%, preferably 10% is present.

30

A DNA according to the invention can exist as such or in a vector. A DNA according to the invention can in particular exist in an expression vector. Examples of such expression vectors are known to one of ordinary skill in the art. In the case of an expression vector for E.coli, these are for example pGEMEX, pUC derivatives, pGEX-2T, pET3b and pQE-8. pY100 and Ycpad1 are

examples for expression in yeast, while pKCR, pEFBOS, cDM8, pCEV4, pCDNA3, pKSV10, pRCMV and pRK5 are examples for the expression in animal cells. The baculo virus expression vector pAcSGHisNT-A is especially suitable for expression in insect cells.

5 One of ordinary skill in the art knows suitable cells for the expression of the DNA according to the invention present in an expression vector. Examples of such cells include the E.coli strains HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21, SG 13009 and M15pRep4, the yeast strain *Saccharomyces cerevisiae*, the animal cells L, NIH 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero, HeLa, Hep62, CCL13 and 293, the insect cells Sf9 and Sf21 and the plant cells *Lupinus albus*.

10 One of ordinary skill in the art knows methods and conditions for the transformation or transfection of cells with an expression vector containing the DNA according to the invention as well as for the cultivation of the cells. He also knows methods for the isolation and the purification of the virus protein expressed by the DNA according to the invention.

15 Further subject matter of the present invention is an antibody directed against the fusion protein mentioned above. Such an antibody can be made by conventional methods. It can be polyclonal or monoclonal. In making it, it is advantageous to immunize animals, in particular rabbits or chickens for a polyclonal antibody and mice for a monoclonal antibody, with the fusion protein. Further 20 "boosters" of the animals with the fusion protein can also take place. The polyclonal antibody can then be obtained from the serum or the egg yolk of the animals. For monoclonal antibodies, the spleen cells of the animals are fused with myeloma cells.

25 Further subject matter of the present invention is a kit. Such a kit includes one or more of the following components:

- (a) a fusion protein according to the invention,
- (b) a DNA according to the invention,
- (c) an antibody according to the invention, as well as
- 30 (d) normal adjuvants such as carriers, buffers, solvents, controls, etc.

One or more representatives for each of the individual components can be present. With regard to the individual terms, reference is made to the above explanations.

The present invention provides a gene transfer system which is specific, in other words with which the desired cells can be reached and genes can be introduced into these cells. The cells can be present individually or in a tissue. Furthermore, the cells can be isolated or can be present in the 5 body of an individual. The present invention is therefore suitable for an ex vivo or in vivo therapy of cells or tissues, respectively. The application of the present invention can be monitored and controlled by antibodies according to the invention.

10 The present invention therefore represents a major step forward as a way of performing directed modifications to cells or tissues by gene therapy.

Short description of the drawings.

15 **Fig. 1** shows the amino acid and DNA sequences of a fusion protein according to the invention which includes an LHBs and the heterologous binding site RGD, wherein the latter replaces the homologous site.

20 **Fig. 2** shows the amino acid and DNA sequences of a fusion protein according to the invention which includes an HBcAg, a cell permeability-mediating peptide of the above amino acid sequence and the heterologous binding site RGD.

The present invention is explained by way of the following examples.

25 **Example 1: Preparation of a particle according to the invention which contains a fusion protein including an LHBs and a heterologous binding site.**

(A) Preparation of an expression vector coding for all HBV-specific proteins with the exception of LHBs

30 To achieve this, one starts from the plasmid pTKTHBV2 (cf. Will et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82 (1985), 891-895). This contains two copies of the HBV genome. A fragment from ntHBV2821 (first copy) to ntHBV2870 (second copy) is amplified in a first PCR. The forward primer (nt 2821-2855) comprises the following sequence: CCA TAT TCT TGG GAA CAA GAT ATC CAG CAC GGG GC. An EcoRV cleavage site is underlined. The triplet ACG between nt 2849-2852 replaces

the ATG start codon of LHBs. The backward primer (nt 2877-2845) comprises the following sequence: GGA TTG CTG GTG GAA GAT ATC TGC CCC GTG CTG. An EcoRV cleavage site is underlined. The triplet CGT between nt 2852-2849 replaces the natural triplet CAT. PCR fragments obtained are digested with EcoRV and are purified on a preparative 1% agarose gel. A 5 fragment of about 3.3 kb in size is eluted from the gel and is stored.

In a second PCR, a forward primer comprising an EcoRV cleavage site followed by the subsequent sequence ntHBV2860 (second copy)-2878 (first copy) (CAG CAC GGG GCA GAT ATC TTC CAC CAG CAA TCC), and a backward primer comprising an EcoRV cleavage site followed by the 10 subsequent sequence ntHBV 2830-2810 (GC CCC GTG CTG GAT ATC ATC TTG TTC CCA AGA ATA TGG) are used. PCR fragments obtained are digested with EcoRV and are purified on a preparative 1% agarose gel. A fragment of the expected size is eluted from the gel and is dephosphorylated. This fragment is used in a ligase reaction with the above fragment of approximately 3.3 kb, wherein the HBV expression vector pTKTHBV2Ldef is obtained. This 15 expression vector codes for all HBV-specific proteins with the exception of LHBs.

(B) Preparation of an expression vector which codes for a fusion protein including an LHBs and the heterologous binding site RGD

20 The fragment ntHBV2990-834 is amplified by PCR starting from the plasmid pTKTHBV2 (cf. above). The 5' primer comprises the following sequence: AAA AGA TCT GGC CGT GGC GAA GGA GCT GGA GCA TTC. This sequence includes a BglII cleavage site followed by an ATG start codon and the sequence coding for the tripeptide RGD. The PreS1-specific reading frame is used. The 3' primer comprises the following sequence: AAA AGA TCT GGT TTA AAT GTA TAC 25 CCA AAG. This sequence includes a BglII cleavage site. PCR fragments obtained are digested with BglII and are inserted in the vector pCDNA.3 (Invitrogen), which has been cleaved with BglII and dephosphorylated, whereby the expression vector pCRGDLHBs is obtained. This expression vector codes for an N-terminally shortened LHBs including the RGD binding site.

30 **(C) Preparation of an expression vector which comprises a structural gene and a packaging signal**

A sequence coding for the HBV packaging signal epsilon, for example ntHBV 1840-1914, is amplified by PCR. An EcoRV cleavage site is introduced via the primer used. The sequence of the

forward primer reads: CCC GAT ATC ATG TCA TCT CTT GTT CAT GTC CTA. The sequence of the backward primer reads: GGG GAT ATC GGT CGA TGT CCA TGC CCC AAA. PCR fragments obtained are cleaved with EcoRV and are inserted in the vector pCDNA.3 (cf. above) which has been cleaved with EcoRV and dephosphorylated, whereby the vector pcVPHBV is obtained. This vector contains the HBV-specific packaging signal epsilon.

Starting from the vector pCeGFP (Invitrogen) coding for a “green fluorescent protein” under the control of the CMV promoter, the sequence containing the CMV promoter and the GFP gene is amplified by PCR. The forward primer has the following sequence: GGG GGA TCC CGA TGT
 10 ACG GGC CAG ATA TAC GCG TTG. The backward primer has the following sequence: GGG GGA TCC GCG GCC GCT TTA CTT GTA. The primers used each contain a BamHI cleavage site. PCR fragments obtained are cleaved with BamHI and are inserted into the vector pCVPHBV (Invitrogen) which has been cleaved with BamHI and dephosphorylated, whereby the expression vector pCVPHBVeGFP is obtained. This expression vector contains the HBV-specific packaging signal epsilon, the CMV promoter and a sequence coding for eGFP.

(D) Preparation of a packaging cell line

Approximately 0.8×10^6 HepG2 cells are transfected with 4 μ g of pTKTHBV2Ldef (cf. (A)) and 2 μ g of pCDNA.3 (cf. (B)) by means of lipofection. pCDNA.3 codes for G418 resistance. 2h after transfection, the cells are transferred into a medium containing 700 mg G418/l. G418- resistant clones are subcultured after 14d. The stable integration of pTKTHBV2Ldef is confirmed by means of PCR and southern blots. The expression of the surface protein SHBs from HBV and from HBcAg is confirmed by means of specific antibodies in ELISAS. The packaging cell line HepG2-TKTHBV2Ldef is obtained. This cell line expresses all HBV-specific proteins with the exception of LHBs.

(E) Preparation of particles according to the invention

30 Approximately 0.8×10^6 cells of the packaging cell line of (D) are transfected with 3 μ g of pCRGDLHBs (cf. (B)) and 3 μ g of pCVPHBVeGFP (cf. (B)) by means of lipofection. 72h after transfection, the cells or their supernatants, respectively, are collected and subjected to a PEG precipitation. Subsequently, a CsCl density gradient centrifugation is performed. The particles

according to the invention are obtained in pure form. These particles include all HBV-specific proteins with the exception of LHBs, which is replaced by a RGD-LHBs.

5 **Example 2: Preparation of a particle according to the invention which contains a fusion protein including an HBcAg, a cell permeability-mediating peptide and a heterologous binding site.**

A DNA coding for a cell permeability-mediating peptide (subsequently referred to as ZPP) is used. This DNA has the following sequence: XXX AGA TCT ATG CCC ATA TCG TCA ATC TTC 10 TCG AGG ATT GGG GAC CCT GGA TCC XXX (X denotes any nucleotide). This sequence has at its 5'-end a BglII cleavage site, followed by an ATG start codon and, at its 3'-end, a BamHI cleavage site. A double stranded DNA molecule based on the above sequence is cut with BamHI/BglII and is inserted into the expression vector pCDNA.3 (cf. above), which has been cleaved with BamHI and dephosphorylated, whereby the expression vector pCZPP is obtained.

15 Furthermore, the expression vector pTKTHBV2 (cf. above) is used to amplify the fragment nt-HBV 1861-2136 by means of PCR. The forward primer includes the following sequence: XXX GGA TCC ACT GTT CAA GCC TCC AAG CTG. This sequence includes a BamHI cleavage site followed by the sequence ntHB 1861-1881. The backward Primer includes the following sequence: 20 XXX GAA TTC TGG ATC TTC CAA ATT AAC ACC CAC CCA. This sequence includes an EcoRI cleavage site followed by the sequence ntHBV 2139-2116. In a second PCR, the fragment ntHBV 2140-2480, which is extended at its 5'-end with the sequence coding for the RGD motif, is amplified. The forward primer includes the following sequence: XXX GAA TTC CGA GGC GAC GCG TCT AGA GAC CTA GTA GTC. This sequence includes an EcoRI cleavage site followed by 25 the sequence coding for the RGD motif, and the sequence ntHBV2140-2161. The backward primer includes the following sequence: XXX AAG CTT TCC CCA CCT TAT GAG TCC AAG. This sequence includes a HindIII-cleavage site and the sequence ntHBV 2480-2460.

30 Fragments obtained from both PCRs are cleaved with EcoRI and are ligated with one another. The ligation product is used as a template for a further PCR, wherein the forward primer from the first PCR is used as a forward primer and the backward primer from the second PCR is used as a backward primer. PCR fragments obtained are cleaved with BamHI/HindIII and are inserted into the vector pCZPP, which has been cleaved with BamHI/HindIII and has been dephosphorylated, whereby the expression vector pCZPPHBcRGC is obtained. This expression vector codes for

HBcAg containing the ZPP sequence at the N-terminus and the RGD sequence in the region of the amino acids 79-82.

Furthermore, approximately 0.8×10^6 HepG2 cells are transfected by means of lipofection with $4 \mu\text{g}$ of an expression vector coding for HBV polymerase and with $2 \mu\text{g}$ pCDN3. Here, reference is made to the previous description from example 1 (D). A cell line denoted as HepG2-HBV Pol is obtained.

Approximately 0.8×10^6 cells of the cell line HepG2-HBV Pol are transfected with $3 \mu\text{g}$ of pCZPPHBc RGC and $3 \mu\text{g}$ of pCVPHBVeGFP (cf. example 1,B) by means of lipofection. Here, reference is made to the above description of example 1(E). Particles according to the invention are obtained in pure form.

Example 3: Detection of the expression of a nucleic acid present in particles according to the invention in fibroblasts

Approximately 1×10^9 particles according to the invention from example 1(E) or example 2 are solubilized in $100 \mu\text{l}$ 0.9% saline and are injected into the tail vein of balb/c mice. The soleus- and the tibialis anterior muscle is isolated at 48h after injection and is slowly frozen in a "tissue tag". Cryo-slices are prepared from the frozen preparation and are analyzed under a fluorescence microscope with blue excitation.

A green fluorescence in the fibroblasts is obtained, indicating the expression of the "green fluorescent protein".

Example 4: Preparation and purification of a fusion protein according to the invention

The fusion protein of Fig.1 according to the invention is made. To this end, DNA from Fig.1 is provided at the 5'-end with a BglII linker and at the 3'-end with a BglII linker and is subsequently cleaved with the corresponding restriction enzymes. The BglII/BglII fragment obtained is inserted into the expression vector pQE8 cleaved with BamHI, so that the expression plasmid pQE8/LHBs is obtained. Such a plasmid codes for a fusion protein made of 6 histidine residues (N-terminus partner) and the fusion protein according to the invention from Fig.1 (C-terminus partner). pQE-8/LHBs is used for the transformation of E.coli SG 13009 (cf. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148,

(1981), 265-273). The bacteria are cultivated in an LB medium with 100 µg/ml ampicillin and 25 µg/ml kanamycin and are induced for 4h with 60 µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside (IPTG). Lysis of the bacteria is achieved by addition of 6 M guanidine hydrochloride, whereafter chromatography (Ni-NTA-Resin) of the lysate is performed in the presence of 8 M urea according 5 to the directions of the manufacturer (Qiagen) of the chromatography material. The bound fusion protein is eluted in a buffer at pH 3.5. Following neutralization, the fusion protein is subjected to 18 % SDS polyacrylamide gel electrophoresis and is stained with coomassie blue (cf. Thomas, J.O. and Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

10 It has been found that a fusion protein according to the invention can be made in highly pure form.

Example 5: Preparation and detection of an antibody according to the invention

A fusion protein of example 4 according to the invention is subjected to 18 % SDS polyacrylamide 15 gel electrophoresis. After staining of the gel with 4 M sodium acetate, a 38 kD band is cut out of the gel and is incubated in phosphate-buffered saline solution. Pieces of the gel are sedimented prior to determination of the protein concentration of the supernatant by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and staining with coomassie blue. Animals are immunized with the gel-purified fusion protein as follows:

20

Immunization protocol for polyclonal antibodies in rabbits

35 µg of gel-purified fusion protein in 0.7 ml PBS and 0.7 ml complete or incomplete Freund's adjuvant are used for each immunization.

25

Day 0: 1. Immunization (complete Freund's adjuvant)

Day 14: 2. Immunization (incomplete Freund's adjuvant;
icFA)

Day 28: 3. Immunization (icFA)

30 Day 56: 4. Immunization (icFA)

Day 80: bleeding

The rabbit serum is tested in an immunoblot. To this end, a fusion protein from example 4 according to the invention is subjected to SDS polyacrylamide gel electrophoresis and is transferred to a nitrocellulose filter (cf. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209).
5 Western blot analysis as described in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229 was performed. To this end, the nitrocellulose filter is incubated for 1 h at 37°C with a first antibody. This antibody is the serum of the rabbit (1:10000 in PBS). After multiple wash steps with PBS, the nitrocellulose filter is incubated with a second antibody. This antibody is a monoclonal goat anti-rabbit IgG antibody (Dianova) coupled with alkaline phosphatase (1:5000) in PBS. After 30 minutes of incubation at 37°C, multiple wash steps with PBS follow and subsequently the alkaline phosphatase detection reaction is performed with development solution (36 µM 5' bromo-4-chloro-10 3-indolylphosphate, 400 µM nitroblue tetrazolium, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) at room temperature until bands become visible.

It has been found that polyclonal antibodies according to the invention can be prepared.

15

Immunization protocol for polyclonal antibodies in chicken

40 µg of gel-purified fusion protein in 0.8 ml PBS and 0.8 ml complete or incomplete Freund's adjuvant are used for each immunization.

20

Day 0: 1. Immunization (complete Freund's adjuvant)

Day 28: 2. Immunization (incomplete Freund's adjuvant;
icFA)

Day 50: 3. Immunization (icFA)

25

Antibodies are extracted from egg yolk and are tested by western blot. Polyclonal antibodies according to the invention are detected.

Immunization protocol for monoclonal antibodies of mice

30

12 µg of gel-purified fusion protein in 0.25 ml PBS and 0.25 ml complete or incomplete Freund's adjuvant are used for each immunization; In the fourth immunization, the fusion protein is solubilized in 0.5 ml (without adjuvant).

Day 0: 1. Immunization (complete Freund's adjuvant)

Day 28: 2. Immunization (incomplete Freund's adjuvant;
icFA)

5 Day 56: 3. Immunization (icFA)

Day 84: 4. Immunization (PBS)

Day 87: fusion

10 Supernatants from hybridomas are tested by western blot. Monoclonal antibodies according to the invention are detected.

SEQUENCE LISTING

<110> Eberhard Hildt, Prof. Hofschneider

<120> Particles for Gene Therapy

<130> 319-2 US

<140> PCT/DE00/00363

<141> 2000-02-04

<150> DE 199 04 800.2

<151> 1999-02-05

<160> 19

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 347

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the artificial sequence:

Fusion protein comprising a LHBs and heterologous binding site
RGD

<400> 1

Met Gly Arg Gly Asp Gly Ala Gly Ala Phe Gly Leu Gly Phe Thr Pro
1 5 10 15

Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu
20 25 30

Glu Thr Leu Pro Ala Asn Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser
35 40 45

Gly Arg Gln Pro Thr Pro Leu Ser Pro Pro Leu Arg Asn Thr His Pro
50 55 60

Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Thr Leu Gln Asp
65 70 75 80

Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Gly
85 90 95

Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Val Ser Pro Ile Ser Ser Ile Phe
100 105 110

Ser Arg Ile Gly Asp Pro Ala Leu Asn Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly
115 120 125

Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr
130 135 140

Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu
145 150 155 160

Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser

165	170	175
Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly		
180	185	190
Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu		
195	200	205
Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met		
210	215	220
Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly		
225	230	240
Pro Cys Arg Thr Cys Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro		
245	250	255
Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro		
260	265	270
Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser		
275	280	285
Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe		
290	295	300
Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp		
305	310	320
Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu		
325	330	335
Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile		
340	345	

<210> 2
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Description of the artificial sequence:
 Fusion protein comprising a HBcAg, a cell-permeability-mediating polypeptide and heterologous binding site RGD

<400> 2

Met Pro Leu Ser Ser Ile Phe Ser Arg Ile Gly Asp Pro Thr Val Gln			
1	5	10	15
Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile Asp Pro			
20	25	30	
Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu Pro Ser			
35	40	45	
Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser Ala Leu			
50	55	60	
Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His His Thr			
65	70	75	80
Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr Leu Ala			
85	90	95	

Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Glu Phe Arg Gly Asp Ala
 100 105 110
 Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys
 115 120 125
 Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
 130 135 140
 Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
 145 150 155 160
 Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
 165 170 175
 Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr
 180 185 190
 Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser
 195 200 205
 Gln Ser Arg Glu Pro Gln Cys
 210 215

<210> 3
 <211> 663
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Description of the artificial sequence:
 DNA coding for a fusion protein comprising a HBcAg, a cell-
 permeability-mediating polypeptide and heterologous binding
 site RGD

<400> 3

atgcccata	cgtcaatctt	ctcgaggatt	ggggaccctg	gatccactac	tgttcaagcc	60	
tccaa	gctgt	gcctgggt	gcttgggc	atggacatcg	acccttataa	agaatttgga	120
gctactgtgg	agttactctc	gttttgcc	tctgacttct	ttccttcagt	acgagatctt		180
ctagataccg	cctcagctct	gtatcggaa	gccttagagt	ctcctgagca	ttgttcacct		240
caccatactg	cactcaggca	agcaattctt	tgctgggggg	aactaatgac	tctagctacc		300
tgggtgggt	ttaatttgg	agatccagaa	ttccgaggcg	acgcgtctag	agacctagta		360
gtcagttat	tcaacactaa	tatgggccta	aagttcaggc	aactcttgc	gtttcacatt		420
tcttgc	tca	ctttggaaag	agaaaccgtt	atagagtatt	tggtgtctt	cggagtgtgg	480
atccgc	actc	ctccagctta	tagaccacca	aatgccccta	tcctatcaac	acttccggaa	540
actactgtt	ttagacgacg	aggcaggtcc	cctagaagaa	gaactccctc	gcctcgcaga		600
cgaagg	tctc	aatcgccgcg	tcgcagaaga	tctcaatctc	ggAACCTCA	atgttagtat	660

tcc

663

<210> 4
 <211> 1047
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Description of the artificial sequence:
 DNA coding for a fusion protein comprising a LHBs and
 heterologous binding site RGD

<400> 4

atggccgtg gcgaaggagc tggagcattc gggctgggtt tcacccacc gcacggaggc	60
ctttgggt ggagccctca ggctcagggc atactacaaa ctttgcagc aaatccgcct	120
cctgcctcca ccaatcgcca gacaggaagg cagcctaccc cgctgtctcc accttgaga	180
aacactcatc ctcaggccat gcagtggaat tccacaacct ttcaccaaac tctgcaagat	240
cccagagtga gaggcctgta tttccctgct ggtggctcca gttcaggagc agtaaaccct	300
gttccgacta ctgcctctcc cttatcgta atcttctcgaa ggattgggaa ccctgcgctg	360
aacatggaga acatcacatc aggattcccta ggacccttc tcgtgttaca ggcggggttt	420
ttcttggta caagaatcct cacaataccg cagagtctag actcggtgt gacttctctc	480
aattttctag gggaaactac cgtgtgtctt ggccaaaatt cgcagtcacc aaccccaat	540
cactcaccaa cctccgtcc tccaaacttgt cctggttatc gctggatgtg tctgcggcgt	600
tttatcatct tcctttcat cctcgatgta tgcctcatct tcttgggtt tcttctggac	660
tatcaaggta tggccgtt ttgtcctcta attccaggat cctcaaccac cagcacggaa	720
ccatgccgaa cctgcgtac tactgctcaa ggaacctcta tgtatccctc ctgttgctgt	780
acccaaacctt cggacggaaa ttgcacctgt attccatcc catcatcctg ggcttcgga	840
aaatttcatat gggagtgggc ctcagccgt ttctcctggc tcagttact agtgcattt	900
gttcagtggt tcgttagggct ttccccact gttggctt cagttatatg gatgatgtgg	960
tattggggc caagtcgtta cagcatctt agtcccttt taccgctgtt accaatttc	1020
ttttgtcttt gggtatacat ttaaacc	1047

<210> 5
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Description of the artificial sequence:
 Primer

<400> 5

ccatattctt ggaaacaaga tatccagcac gggc

35

<210> 6
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the artificial sequence:
Primer

<400> 6

ggattgctgg tggaagatat ctgccccgtg ctg

33

<210> 7
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the artificial sequence:
Primer

<400> 7

cagcacgggg cagatatctt ccaccagcaa tcc

33

<210> 8
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the artificial sequence:
Primer

<400> 8

ccccctgct ggatatcatc ttgttcccaa gaatatgg

38

<210> 9
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the artificial sequence:
Primer

<400> 9

aaaagatctg gccgtggcga aggagctgga gcattc

36

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the artificial sequence:
Primer

<400> 10

aaaagatctg gtttaatgt atacccaaag

30

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the artificial sequence:
Primer

<400> 11

cccgatatac tgtcatctct tgttcatgtc cta

33

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the artificial sequence:
Primer

<400> 12

ggggatatcg gtcgatgtcc atgccccaaa

30

<210> 13

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the artificial sequence:
Primer

<400> 13

gggggatccc gatgtacggg ccagatatac gcgttg	36
<210> 14	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Description of the artificial sequence:	
Primer	
<400> 14	
gggggatccg cggccogcttt acttgta	27
<210> 15	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Description of the artificial sequence:	
Primer	
<400> 15	
nnnagatcta tgcccatatc gtcaatcttc tcgaggattg gggaccctgg atccnnn	57
<210> 16	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Description of the artificial sequence:	
Primer	
<400> 16	
nnnggatcca ctgttcaagc ctccaagctg	30
<210> 17	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Description of the artificial sequence:	
Primer	
<400> 17	
nnnngaattct ggatcttcca aatthaacacc caccca	36

<210> 18
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the artificial sequence:
Primer

<400> 18

nnngaattcc gaggcgacgc gtctagagac ctagtagtc

39

<210> 19
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of the artificial sequence:
Primer

<400> 19

nnnaagcttt ccccacctta tgagtccaag

30

CLAIMS

1. Particle, comprising
 - 5 (a) a protein envelope with a fusion protein comprising a virus protein, a cell permeability-mediating peptide and a heterologous cell-specific binding site and
 - (b) a nucleic acid sequence present in the protein envelope, which comprises the sequences for a virus-specific packaging signal and a structural gene.
- 10 2. Particle according to claim 1, wherein the virus protein is derived from an adenovirus, adeno-associated virus, vaccinia virus, baculovirus or hepadnavirus.
3. Particle according to claim 2, wherein the hepadnavirus is a hepatitis B virus.
- 15 4. Particle according to any of claims 1-3, wherein the virus protein is a surface protein.
5. Particle according to claim 4, wherein the surface protein is an LHBs.
6. Particle according to any of claims 1-3, wherein the virus protein is a core protein.
- 20 7. Particle according to claim 6, wherein the core protein is an HBcAg.
8. Particle according to any of claims 1-7, wherein the cell permeability-mediating peptide comprises the following amino acid sequence: P L S S I F S R I G D P.
- 25 9. Particle according to any of claims 1-8, wherein the heterologous cell-specific binding site is RGD.
10. Particle according to any of claims 1-9, wherein the fusion protein is that in Fig.1 or 2.
- 30 11. Method for the preparation of the particle according to claim 1, wherein the fusion protein contains an LHBs and a heterologous cell-specific binding site, comprising the following method steps:

5 (a) cotransfection of cells which code for a hepatitis B virus genome, wherein these cells do not express LHBs, with a first expression vector coding for a fusion protein which comprises an LHBs and a heterologous cell-specific binding site, and with a second expression vector comprising a virus-specific packaging signal and a structural gene, and

(b) isolation and purification of the particle.

10 12. Method for the preparation of the particle according to claim 1, wherein the fusion protein comprises an HBcAg, a cell permeability-mediating peptide and a heterologous cell-specific binding site, comprising the following method steps:

15 (a) cotransfection of cells coding for an HBV polymerase with a first expression vector coding for a fusion protein which comprises an HBcAg, a cell permeability-mediating peptide and a heterologous cell-specific binding site, and with a second expression vector comprising a virus-specific packaging signal and a structural gene, and

(b) isolation and purification of the particle.

20 13. Fusion protein, comprising a virus protein, a cell permeability-mediating peptide and a heterologous cell-specific binding site.

25 14. Fusion protein according to claim 13, comprising the amino acid sequence of Fig.1 or 2 or an amino acid sequence differing therefrom by one or more amino acids.

15. DNA, which codes for the fusion protein according to claim 13.

25 16. A DNA, which codes for the fusion protein according to claim 14, including,

(a) the DNA from Fig.1 or 2 or a DNA differing therefrom in one or more base pairs, or

(b) a DNA which is related to the DNA of (a) by virtue of the degenerate genetic code.

30 17. Expression vector, which codes for the DNA according to claim 16.

18. Use of the particle according to any of the claims 1-10 for gene therapy of tissues and cells.